

Showdo mycinの発見とその作用機構に関する研究

著者	小松 良英
号	66
発行年	1972
URL	http://hdl.handle.net/10097/12617

氏 名 (本籍) こ まつ よし ひで
小 松 良 英 (福島県)

学 位 の 種 類 農 学 博 士

学 位 記 番 号 農 第 6 6 号

学位授与年月日 昭 和 4 7 年 1 1 月 9 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

最 終 学 歴 昭 和 3 5 年 3 月
東北大学農学部卒業

学位論文題目 Showdomycin の発見とその作用
機構に関する研究

論文審査委員 (主 査)
教授 高 橋 甫 教授 志 村 憲 助

教授 玉 利 勤 治 郎

論文内容要旨

1. 緒 論

著者は1968年に、香川県小豆島の土壌より分離した一放線菌の培養液から新抗生物質 **showdomycin** (以下 **SHM** と略す) を単離した。

本物質は広範囲な細菌類と、マウスおよびラットのエールリッヒ腹水腫瘍に阻害作用を示した。この作用は種々なヌクレオシドおよび **SH** 化合物で **reverse** されると言う特異な性質を示した。

SHM の構造は1967年になって **Darnall** ら、中川ら、および佃らによって 2-(β -D-ribofuranosyl) maleimide と決定された。この構造はヌクレオシドである **uridine** あるいは **pseudouridine** に類似しかつ蛋白質などの **SH** 基、アミノ基およびイミダゾール基に対して付加あるいはアルキル化作用を有する **maleimide moiety** を所有していることが指摘された (Fig. 1)。

本物質は新規な作用機構によって細菌および腫瘍細胞の生命維持機構を阻害している事が予想されたので種々大腸菌を用いてその作用機構を検討した。その結果 1) 大腸菌 **DNA** 合成に対する新規な阻害機構、2) ヌクレオシド透過系による本抗生物質の細胞膜透過機構、3) 大腸菌の本抗生物質に対する耐性獲得機構などについて若干の知見が得られたので以下に報告する。

2. **SHM** の発見

被検菌を代謝物質を含まない最少培地に生育させて抗菌力を検定すると、完全培地で検定したのでは検出々来ないような抗菌力を検出することが出来た。

Streptomyces Z-452 の培養液は最少培地で生育する大腸菌および枯草菌に抗菌力を示し、この抗菌力は **yeast extract** の添加で **reverse** された。この培養液はマウスのエールリッヒ腹水腫瘍細胞との接触テストで抗腫瘍性を示した。この培養液から拮抗性の作用を有する新抗生物質 **SHM** を単離した。

3. **SHM** の生物活性

Table 1 に示す如く、本抗生物質は各種のグラム陽性、グラム陰性の細菌類の生育を阻害した。またマウスのエールリッヒ腹水腫瘍細胞の生育を阻害した。そして同腫瘍細胞を接種されたマウスに対し **SHM** で治療をほどこすと延命効果のあることが観察された (Fig. 2)。

4. **SHM** の作用を **reverse** する物質

yeast extract 中にあって **SHM** の抗菌力を **reverse** する物質は **adenosine** および

uridine などのヌクレオシド類であった。Table 2 に示したように SHM の抗菌力を reverse する作用は多くのヌクレオシドに於いて認められた。ヌクレオシドとは構造を全く異にする各種の SH 化合物にも SHM の抗菌力を reverse する作用が認められた。SHM の抗腫瘍作用もヌクレオシドで reverse された。

5. ヌクレオシドおよび SH 化合物による SHM 阻害作用の reverse

SHM の阻害作用はヌクレオシドおよび SH 化合物によって 2 種類の影響を受けた。

その 1 つは、予め SHM とこれらの化合物が共存した場合に SHM の阻害作用の発現が抑制される性質である。抑制の度合は共存するヌクレオシドあるいは SH 化合物の濃度に依存していた (Fig. 3)。SHM と構造が類似すると考えられた pseudouridine はこの抑制作用が極めてよかった。SHM の maleimide moiety に構造が類似する N-ethylmaleimide (NEM) の阻害作用の発現はヌクレオシドでは抑制されなかったので SHM と NEM とは作用機構を一部異にすると考えられた。

もう 1 つは、一度始まった SHM による阻害が後からヌクレオシドあるいは SH 化合物を加えることによってときほぐされる性質である。Fig. 4 に示した如く、大腸菌に SHM を充分作用させて蛋白合成および核酸合成を完全に停止させた後でヌクレオシドを加えたところ同菌の蛋白合成、核酸合成能が回復して来た。同様な現象はヌクレオシドの代りに SH 化合物を加えた場合も観察された。NEM による阻害は SH 化合物を加えたときだけときほぐされた。

6. SHM による DNA 合成阻害の機構

大腸菌の細胞壁合成、蛋白合成、RNA 合成および DNA 合成におよぼす SHM の影響を標識前駆体のとりこみを指標として調べた結果、SHM によって DNA 合成が特に強く阻害されていることがわかった。Table 3 は各種大腸菌の DNA 合成、RNA 合成および蛋白合成におよぼす SHM の影響を調べた結果で、いずれの株に於いても SHM が thymine の DNA へのとりこみを preferential に阻害していた。

DNA 合成がどの段階で阻害されているのかを明らかにするため、*E. coli* B-3 株 (:thymine 要求株) に thymine- ^3H と uracil- ^{14}C を、*E. coli* K-12 株に uracil- ^{14}C を与えて、これらアイソトープのデオキシヌクレオチドプールへのとりこみと DNA へのとりこみを調べた。その結果は Table 4 に示した如く、SHM は thymine- ^3H のデオキシチミジル酸プールへのとりこみは阻害せず uracil- ^{14}C のデオキシシチジル酸プールへのとりこみとデオキ

シチミジル酸プールへのとりこみを阻害していることがわかった。uracil- ^{14}C のデオキシウリジル酸プールへのとりこみは阻害しなかった。

これらの現象を理解するために、各種大腸菌の無細胞抽出液を用いて標識化合物から種々なデオキシヌクレオチドの生成を試み、これにおよぼす SHM の影響を調べた結果、Table 5 に要約した如く、SHM は ADP、GDP、CDP および UDP からの夫れ夫れのデオキシヌクレオチドの生成を阻害し、また dUMP からのデオキシチミジル酸の生成をも阻害することが明らかとなった。Uracil からのデオキシウリジンの生成、デオキシウリジンからのデオキシウリジル酸の生成、thymine からのデオキシチミジル酸の生成（および dTDP、dTTP の生成）は阻害しなかった。これらの事実は、Fig. 5 に模式的に示した如く、SHM は大腸菌リボヌクレオチド還元酵素系によってリボヌクレオシドニリン酸からデオキシリボヌクレオシドニリン酸が生成される段階と、dTMP 合成酵素系によって dUMP から dTMP が生成される段階とを阻害することを示唆しているように思われる。SHM はデオキシチミジンホスホリラーゼおよびデオキシチミジンキナーゼの関与する salvage 経路によるデオキシチミジル酸、デオキシウリジル酸の生成は阻害しないことが示唆された。

7. SHM の細胞膜透過機構

SHM 産生菌に acetate-2- ^{14}C を与え、培養液から標識 SHM (: SHM- ^{14}C) を調製した。これを大腸菌に種々な条件で与え細胞内へのとりこみを rapid chilling and rapid Millipore filtration 法で測定した。

SHM- ^{14}C は 37°C に於いて Fig. 6 に示す経過で細胞内へとりこまれた。このとりこみは、Fig. 7 に示す如く、培養温度に依存し、電子伝達系阻害剤である sodium azide や SH 阻害剤である NEM で阻害された。

SHM- ^{14}C のとりこみは各種のヌクレオシドで強く阻害された (Fig. 8)。しかしヌクレオシド以外の核酸関連物質では阻害されなかった。SHM- ^{14}C のとりこみは adenosine によって見掛け上、競合的に阻害された。従って SHM と adenosine とはそのとりこみの機構に於いて共通の site をもっていることが考えられる。

SH 化合物も SHM- ^{14}C の細胞内へのとりこみを強く阻害することがわかった (Table 6)。

ヌクレオシドおよび SH 化合物は細胞内にとりこまれた SHM- ^{14}C の排出には全く影響を与えなかった。従って、これらの化合物は SHM- ^{14}C の細胞内への透過を阻害しているものと思われる。

ヌクレオシドあるいは SH 化合物が SHM の阻害作用を reverse する原因はこれらの化合物が

SHM の細胞内への透過を妨げるためだと考えられる。ヌクレオシドは細胞膜上で共通の透過系をめぐって SHM と競合することによって、また SH 化合物は SHM と直接反応して SHM を細胞膜を透過しにくい化合物に変えることによって、それぞれ SHM の細胞内への透過を阻害していると考えられる。

SHM- ^{14}C の細胞内への透過機構とは別に、細胞内の SHM- ^{14}C (あるいはその代謝物質) を細胞外に排出する機構が存在した。この機構によって SHM 阻害からの回復が導かれているものと考えられる。大腸菌に SHM- ^{14}C を与えて細胞内へとりこませた後で 2-mercaptoethanol あるいは adenosine を加えて SHM- ^{14}C の細胞内への透過をとめると細胞自身が持つ排出機構によって細胞内 SHM- ^{14}C が排出され、細胞内 SHM- ^{14}C 濃度は Fig. 9 に示す経過で低下した。

8. 大腸菌の SHM に対する耐性獲得機構

大腸菌 K-12 株を変異誘起剤 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine で処理することによって多数の SHM 耐性変異株を分離してその性質を親株と比較した。その結果、著者の得た変異株は 1) 全て NEM に感受性であった、2) SHM- ^{14}C と多くの標識ヌクレオシドのとりこみ能が低下していた (Table 7)、3) これらとりこみ能の低下の原因は細胞膜のヌクレオシド透過能の低下に由来していることが caffeine 処理細胞の adenosine- ^3H のとりこみ能の低下などによって示唆された。

これらの結果は、a) SHM の透過機構とヌクレオシドの透過機構とは確かに密接なものであること、b) SHM に対する大腸菌の耐性獲得機構の一つは SHM の透過系の欠損に由来すること、などを示しているように考えられる。

9. 結 論

SHM は大腸菌の細胞膜をヌクレオシドアナログとしてヌクレオシド専用の透過系にのって透過し、細胞内では SHM の maleimide moiety に基づく特有の作用によって DNA 合成系に precursor を供給しているリボヌクレオチド還元酵素系および dTMP 合成酵素系を阻害しこれによって DNA 合成に重大な障害をおよぼしているものと考えられる。

Fig. 1 Structure of SHM

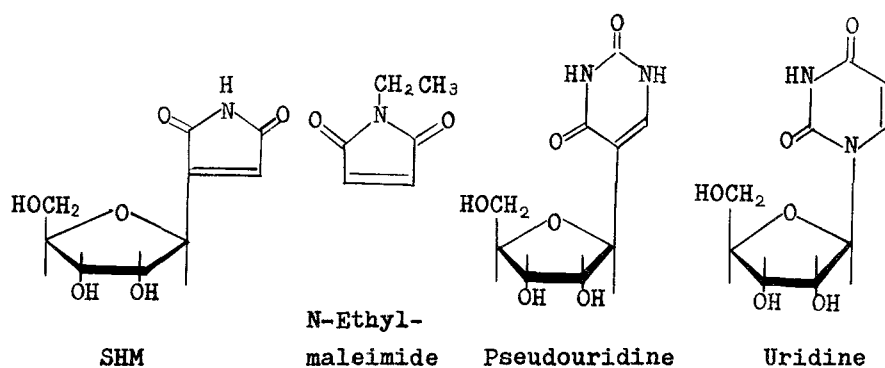


Fig. 2 Survival curve of Ehrlich ascites tumor-bearing mice treated with SHM

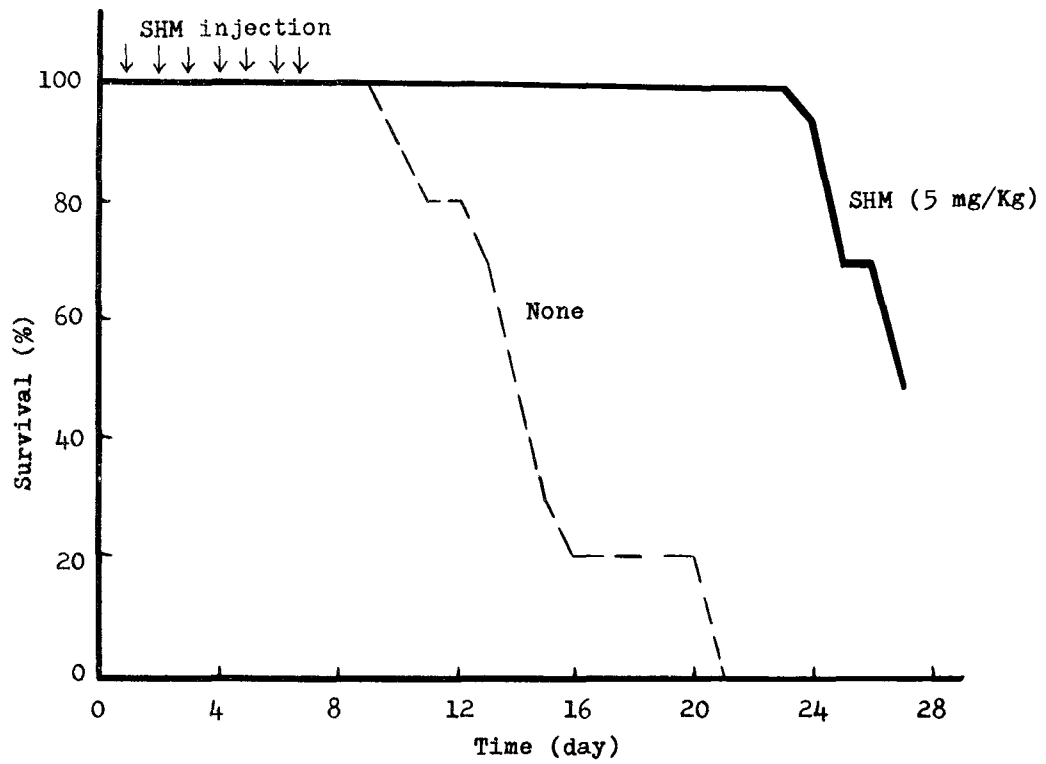


Table 1 Antibacterial spectrum of SHM

Test organism	Minimal inhibitory concentration, µg/ml
1. <u>Shigella dysenteriae</u>	10
2. <u>Shigella paradysenteriae</u> , Ohara	20
3. <u>Salmonella typhosa</u>	50
4. <u>Salmonella paratyphi A</u>	50
5. <u>Escherichia coli</u> Umezawa	50
6. <u>Klebsiella pneumoniae</u>	50
7. <u>Bacillus anthracis</u>	20
8. <u>Bacillus subtilis</u> PCI-219	50
9. <u>Staphylococcus aureus</u> 209-P	50
10. <u>Salutina lutea</u>	50
11. <u>Diplococcus pneumoniae</u> , type II	50
12. <u>Streptococcus hemolyticus</u> D	2
13. <u>Streptococcus hemolyticus</u> HA	2
14. <u>Corynebacterium diphtheriae</u> S	10
15. <u>Corynebacterium diphtheriae</u> , Tront	10
16. <u>Staphylococcus aureus</u> 209-P	50
17. <u>Mycobacterium tuberculosis</u> <u>var hominis</u> H ₃₇ R _v	> 200

Culture medium: 1 ~ 10, beef extract; 11 ~ 16, beef extract + 5% rabbit blood; 17, Kirchner medium + 10% human plasma.

Table 2 Reversal of the inhibitory action of SHM
by nucleosides and thiol compounds

Additions ^{a)}	The changes in dry weight of cells ^{b)}	
	with SHM ^{c)}	without SHM
None	-57.0	128.9
Adenosine	156.3	128.9
Cytidine	131.3	111.3
Uridine	132.8	112.5
Thymidine	122.7	112.5
Inosine	165.6	113.3
Deoxyadenosine	124.2	185.2
Deoxyguanosine	138.3	118.7
Deoxycytidine	160.9	118.7
Deoxyuridine	143.0	109.4
L-Cysteine	99.2	95.3
L-Glutathione	128.1	105.7
2-Mercaptoethanol	99.2	100.0

a) each 2 mM.

b) mg/100 mg of initial cells/3 hr at 37°C.

c) 20 μM.

Fig. 3 Reversal effect of nucleoside and thiol compound on the SHM-inhibition of the synthesis of nucleic acids in E. coli K-12 cells

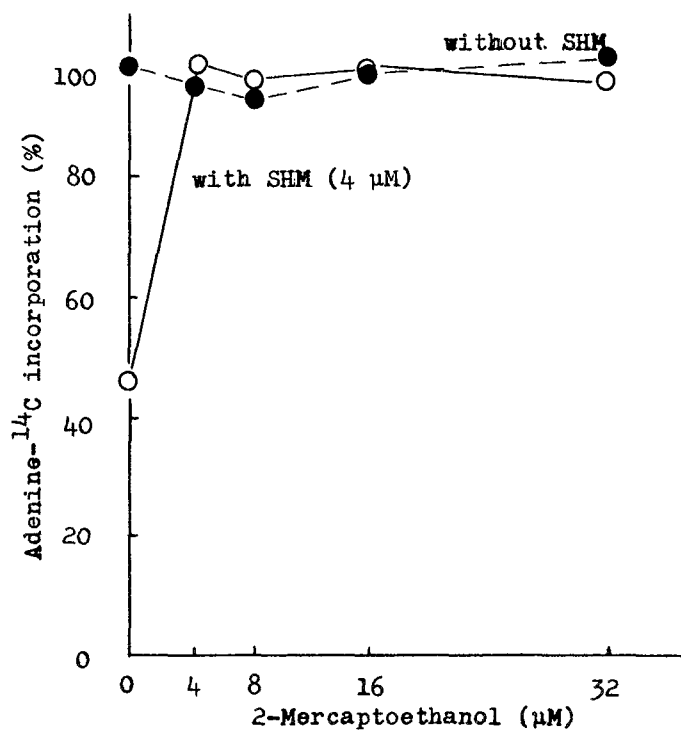
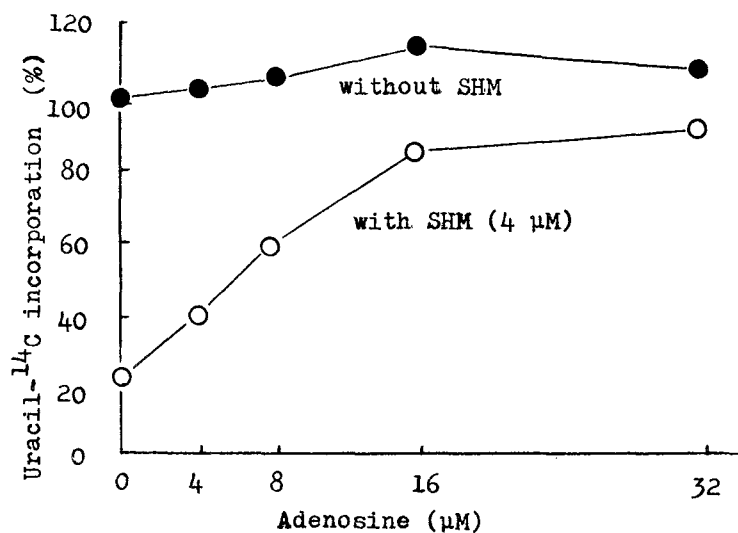
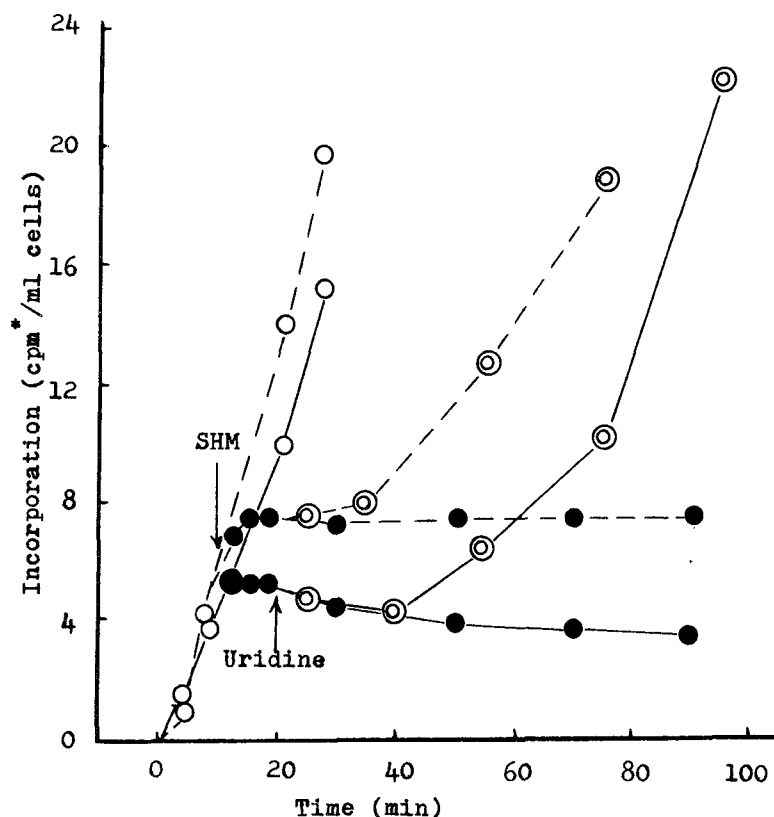


Fig. 4 Time course of the SHM-inhibition and its reversal by uridine



E. coli K-12 cell suspension containing 20 μM of adenine- ^{14}C and 10 μM of leucine- ^3H was incubated under shaking at 37°C . SHM was added to the experimental culture to give a final concentration of 10 μM at 10 min after the beginning of incubation. Uridine was added to the SHM-treated culture to give a final concentration of 200 μM at 10 min after the SHM-treatment. ---, Incorporation of leucine- ^3H ; —, incorporation of adenine- ^{14}C into the corresponding macromolecules of the normal cells (○), the SHM-treated cells (●) and the uridine-treated cells after the SHM-treatment (⊙), respectively. * $\times 10^{-3}$ for ^3H , $\times 10^{-2}$ for ^{14}C .

Table 3 Effect of SHM on the incorporation of thymine- ^{14}C , uracil- ^{14}C and lysine- ^3H into the corresponding macromolecules in E. coli cells

Strain	SHM added (μM)	Incorporation (cpm ^a)		
		Thymine- ^{14}C	Uracil- ^{14}C	Lysine- ^3H
W-3110T ⁻	0	1200	2207	7210
	1	750	2266	7127
	2	352	2088	6340
W-3102T ⁻	0	790	1877	8084
	1	572	1569	7239
	2	388	1386	6573
B-3	0	2915	9358	17984
	1	602	10729	15019
	2	121	6556	10715

E. coli cells were incubated with cited amounts of SHM and one or two of the labeled precursors at 37°C for 24 min under shaking. The incorporations of labeled precursors into cold trichloroacetic acid (5%)-insoluble fractions were measured by using Millipore filter.

a) cpm per cells obtained from one ml of the incubation mixture.

Table 4 Effect of SHM on the incorporations of uracil- ^{14}C and thymine- ^3H into the corresponding deoxyribonucleotides pools and the DNA in E. coli cells

Strain	SHM added (μM)	Incorporation of uracil- ^{14}C (cpm ^a)			DNA	Incorporation of thymine- ^3H (cpm ^a)	
		dUMP	dCMP	dTMP		dTMP	DNA
B-3	0	1344		-	1134	223	4424
	11	485		-	64	391	785
K-12	0	435	334	172	2642		
	4.5	407	155	74	377		

E. coli B-3 cell suspension containing 0.08 μM of thymine- ^3H and 6.6 μM of uracil- ^{14}C was incubated with or without the addition of SHM under shaking at 37°C for 10 min.

E. coli K-12 cell suspension containing 3.3 μM of uracil- ^{14}C was incubated with or without SHM under shaking at 37°C for 12 min.

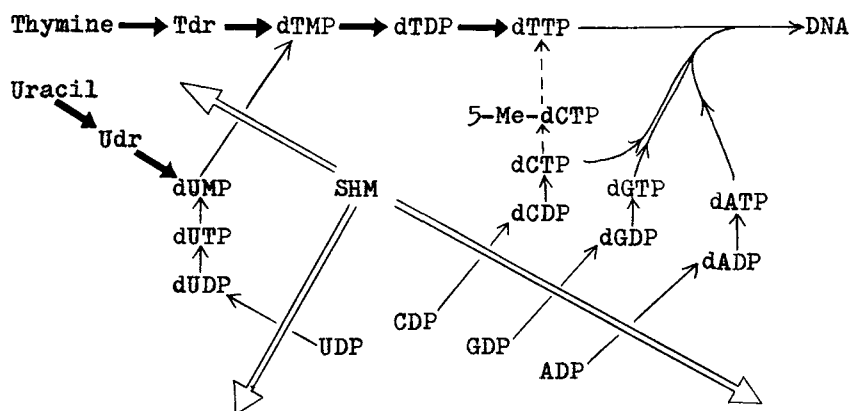
a) cpm per cells obtained from one ml of the incubation mixture.

Table 5 Effect of SHM on the syntheses of deoxyribonucleotides in cell-free extracts of E. coli

Source of extract	Substrate(s) added	SHM added	Deoxyribonucleotide formed (cpm ^a)				
			dCMP	dUMP	dGMP	dAMP	dTMP
B-3	CDP- ¹⁴ C	0	15387				
		80	1478				
B-3	UDP- ³ H	0		354			
		80		104			
B-3	GDP- ¹⁴ C	0			3204		
		100			1068		
B-3	ADP- ¹⁴ C	0				630	
		100				372	
B-3	Uracil- ¹⁴ C + Adr	0		1853			
		100		2153			
K-12	Uracil- ¹⁴ C + Adr	0		4033			37479
		100		17065			25547
B-3	Thymine- ³ H + Adr	0					2035
		100					2075

a) cpm per mg of protein.

Fig. 5 Effect of SHM on the syntheses of deoxyribonucleotides
in E. coli cells

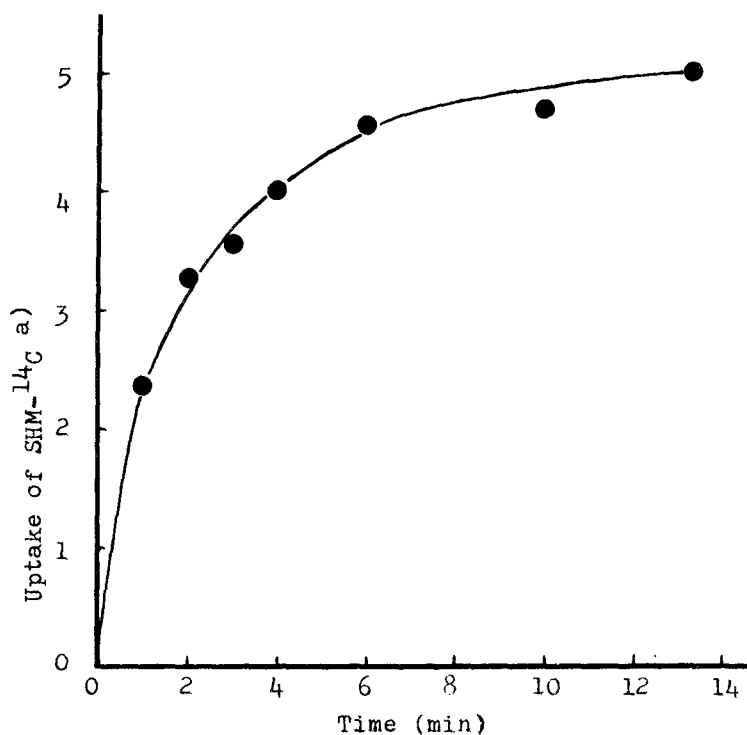


Unshaded arrows (\Rightarrow) indicate inhibitory effects.

Shaded arrows (\longrightarrow) indicate resistance against SHM.

Dotted arrows ($- - \rightarrow$) indicate a hypothetical alternative pathway for the formation of dTTP.

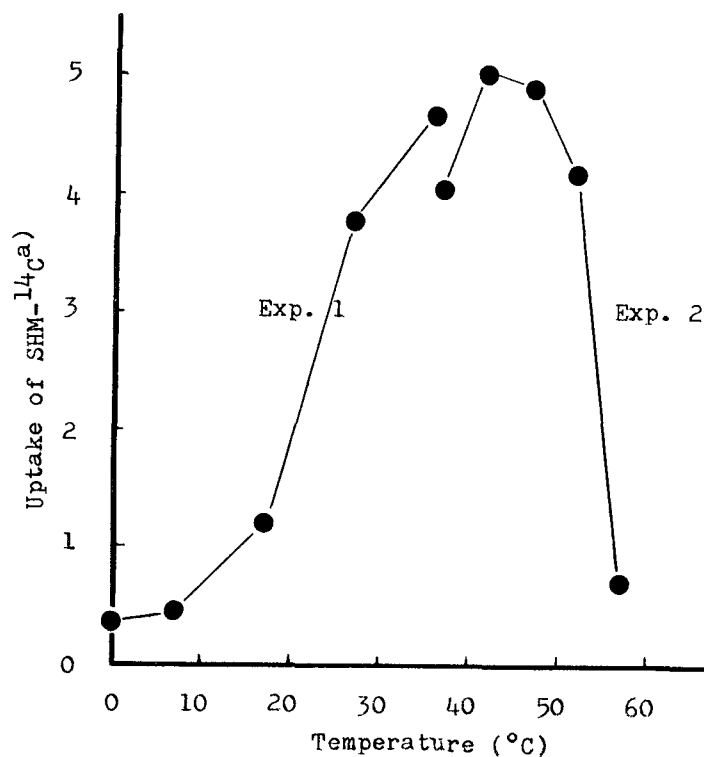
Fig. 6 Dependence of total uptake of SHM- ^{14}C
into E. coli K-12 cells with time



The cell suspension was incubated at 37°C in the presence of $10\ \mu\text{M}$ SHM- ^{14}C . 1-ml aliquots were removed after the indicated periods and prepared for counting.

a) 10^{-18} moles/cell

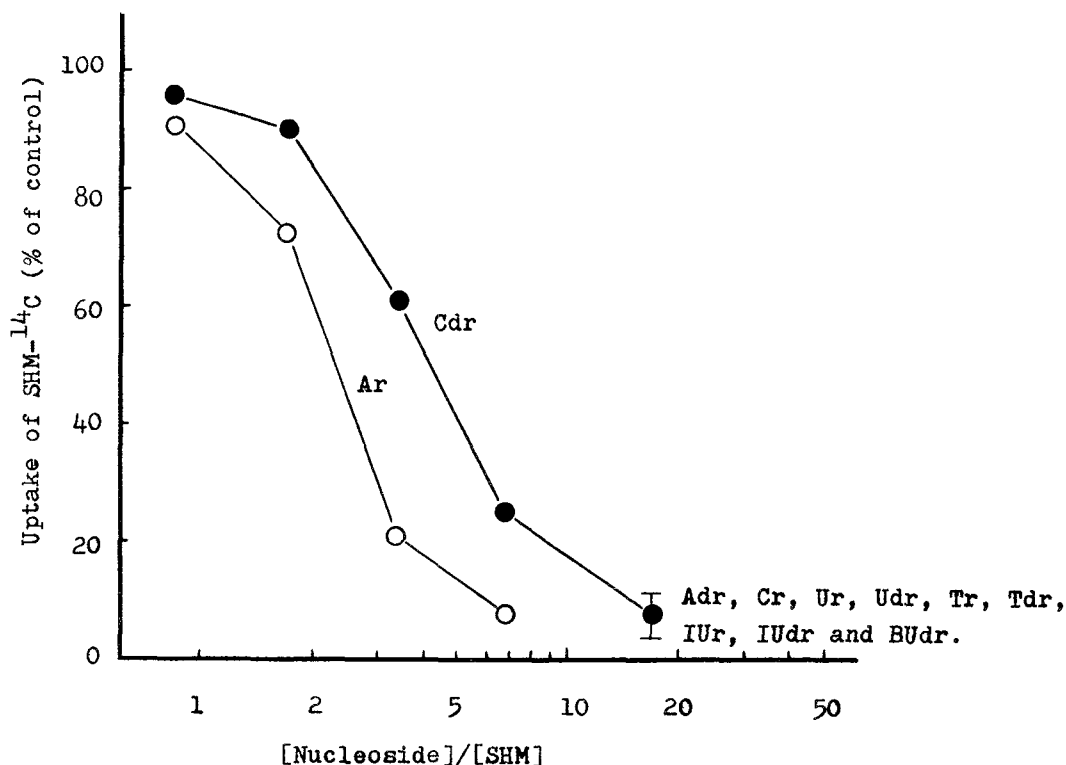
Fig. 7 Effect of temperature on the uptake of SHM- ^{14}C by E. coli K-12 cells



After the cell suspension had been allowed to equilibrate for 6 min at the desired temperature, 1-ml samples of the cell suspension were added to tubes containing SHM- ^{14}C and incubated at that temperature respectively for 4 min. The cells were collected on a Millipore filter, washed, and the total radioactivity of cells was determined.

a) 10^{-18} moles/cell

Fig. 8 Effect of nucleosides on the uptake of SHM- ^{14}C by E. coli K-12 cells



The cell suspensions were allowed to equilibrate at 37°C for 6 min, 1-ml samples of the cells were then transferred to incubation tubes containing SHM- ^{14}C (10 μM final concentration) and cited amounts of the nucleoside being tested. After a 4-min incubation, cells were washed and its total radioactivity was determined. The values are expressed as percent uptake of the untreated controls.

Abbreviation: Ar, adenosine; Adr, deoxyadenosine; Cr, cytidine; Cdr, deoxycytidine; Ur, uridine; Udr, deoxyuridine; Tr, thymidine; Tdr, deoxythymidine; IUr, 5-iodouridine; IUdr, 5-iododeoxyuridine; BUdr, 5-bromodeoxyuridine.

Table 6 Effect of sulfhydryl compounds on the uptake of SHM-¹⁴C by E. coli K-12 cells

Exp.	Sulfhydryl compounds (μ M)		Uptake of SHM- ¹⁴ C (cpm/ml cells)
I	None		2239
	2-Mercaptoethanol	(383)	33
II	None		2269
	L-Cysteine	(171)	33
	L-Glutathione	(171)	91
	Dithiothreitol	(171)	20

In Exp. I, the cell suspension was allowed to equilibrate at 37°C for 10 min, 1-ml samples of the cells were then transferred to incubation tubes containing SHM-¹⁴C (10 μ M final concentration) with or without 2-mercaptoethanol. After a 4-min incubation at 37°C, cells were washed and its total radioactivity was determined.

In Exp. II, the cell suspension was allowed to equilibrate at 37°C for 6 min, 1-ml samples of the cells were then transferred to incubation tubes containing SHM-¹⁴C (10 μ M final concentration) and 171 μ M (final concentration) of L-cysteine, L-glutathione, or dithiothreitol. After a 4-min incubation at 37°C, cells were washed and its total radioactivity was determined.

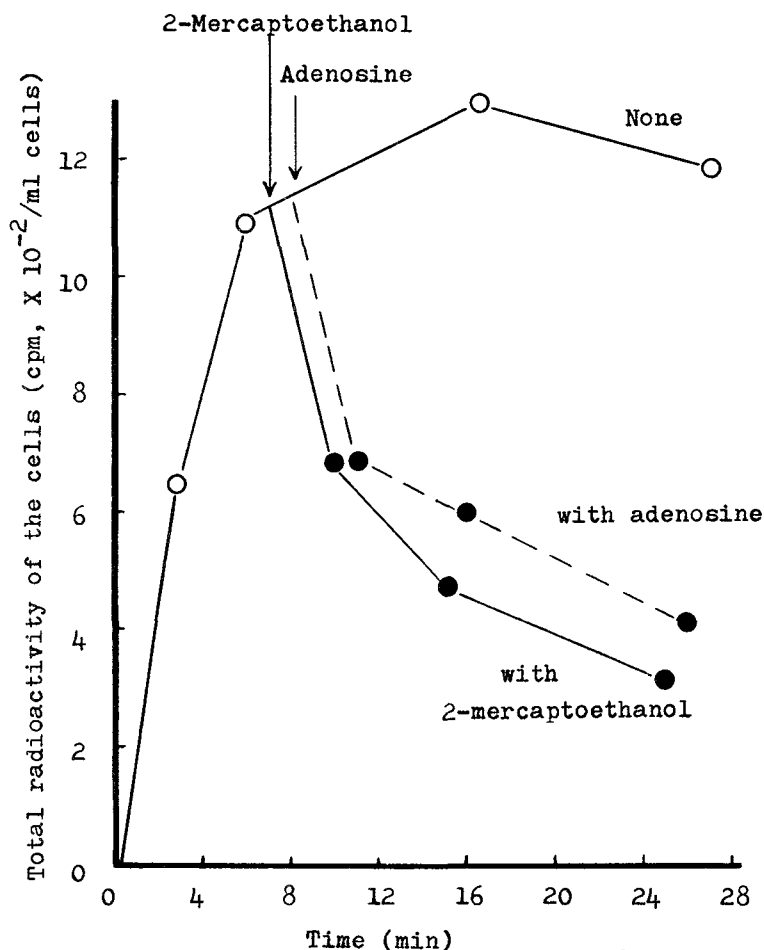
Table 7 Reduced ability of the SHM-resistant mutant
to take up various nucleosides and SHM at 0°C

Labeled nucleoside and base	Uptake ^{a)}	
	Parent	Mutant
SHM- ¹⁴ C	0.080	0.009
Adenosine- ³ H	0.104	0.031
Deoxyadenosine- ¹⁴ C	0.179	0.044
Deoxyguanosine- ¹⁴ C	0.070	0.044
Uridine- ¹⁴ C	0.095	0.048
Cytidine- ³ H	0.070	0.022
Deoxycytidine- ¹⁴ C	0.085	0.031
Deoxythymidine- ¹⁴ C	0.029	0.008
Cytosine arabinoside- ³ H	0.028	0.023
Uracil- ¹⁴ C	0.196	0.261

a) nano moles/ml cells ($OD_{660} = 0.1$)/6 min at 0°C.

After the cell suspensions of parent (*E. coli* K-12) and SHM-resistant mutant Shm^R -001 had been allowed to equilibrate for 6 min at 0°C, one ml samples were added to tubes containing labeled nucleosides (each 10 μ M final concentration), and incubated for 6 min at 0°C. The cells were collected on a Millipore filter, washed, and the total radioactivity of cells was determined.

Fig. 9 Effect of 2-mercaptoethanol and adenosine on the plateau level of accumulation of SHM- ^{14}C by E. coli K-12 cells



15 ml of the cell suspension (5.6×10^8 cells/ml) was added to a tube containing $11.7 \mu\text{M}$ (final concentration) SHM- ^{14}C (522,906 cpm/ μmole) and incubated at 37°C . At 7 and 8 min after the beginning of incubation, 4-ml aliquots of the cell suspension were transferred to a tube containing 2-mercaptoethanol ($400 \mu\text{M}$ final concentration) and to one containing adenosine ($400 \mu\text{M}$ final concentration), respectively. Separate aliquots (1 ml) of the suspension were used to follow uptake over each time interval.

論文

- 1) H. Nishimura, M. Mayama, Y. Komatsu, H. Kato, N. Shimaoka and Y. Tanaka, 1964, Showdomycin, a new antibiotic from a Streptomyces sp. J. Antibiotics, Ser. A 17, 148 - 155.
- 2) H. Nishimura and Y. Komatsu, 1968, Reversal of inhibiting action of showdomycin on the proliferation of Escherichia coli by nucleosides and thiol compounds. J. Antibiotics, 21, 250 - 254.
- 3) Y. Komatsu and K. Tanaka, 1968, Mechanism of action of showdomycin. Part I. Effect of showdomycin on the syntheses of nucleic acids and protein in Escherichia coli K-12. Agr. Biol. Chem., 32, 1021 - 1027.
- 4) Y. Komatsu and K. Tanaka, 1970, Mechanism of action of showdomycin. Part II. Effect of showdomycin on the synthesis of deoxyribonucleic acid in Escherichia coli. Agr. Biol. Chem., 34, 891 - 899.
- 5) Y. Komatsu and K. Tanaka, 1971, Mechanism of action of showdomycin. Part III. Effect of showdomycin on the syntheses of deoxyribonucleotides in cell-free extracts of Escherichia coli. Agr. Biol. Chem., 35, 526 - 536.
- 6) Y. Komatsu, 1971, Mechanism of action of showdomycin. Part IV. Interactions between the mechanisms for transport of showdomycin and of various nucleosides. Agr. Biol. Chem., 35, 1328 - 1339.
- 7) Y. Komatsu, 1971, Preparation of ^{14}C -labeled showdomycin. J. Antibiotics, 24, 566 - 571.
- 8) Y. Komatsu, 1971, Mechanism of action of showdomycin. Part V. Reduced ability of showdomycin-resistant mutants of Escherichia coli K-12 to take up showdomycin and nucleosides. J. Antibiotics, 24, 876 - 883.

- 9) H. Nishimura and Y. Komatsu, 1968, Isolation and characterization of showdomycin.
Annual Report of Shionogi Research Laboratory, No. 18, 10-12.
- 10) H. Nishimura and Y. Komatsu, 1968, Reversal of inhibiting action of showdomycin on the proliferation of Escherichia coli by nucleosides and thiol compounds.
Annual Report of Shionogi Research Laboratory, No. 18, 42-46.

審 査 結 果 の 要 旨

本論文は著者が一放線菌の生産物として分離した新抗生物質 Showdomycin（以下 SHM）の発見にいたる経過と，SHM の主として大腸菌に対する作用機作を解明したものである。

著者は香川県小豆島の土壌から分離された一放線菌が最少培地において新抗生物質 SHM を生産することを発見し，これを単離した。本物質は各種細菌とマウスの Ehrlich 腹水腫瘍細胞の生育を阻害する作用がある。阻害は各種のヌクレオシドおよび SH 化合物により解除されるという特異な性質がある。

次いで著者は大腸菌の DNA，RNA，たんぱく質，および細胞壁などの生合成におよぼす SHM の影響を調べた結果，SHM は DNA 合成を特に強く阻害することを認めた。大腸菌の無細胞抽出液を用い，標識化合物から種々のデオキシヌクレオチドの生成に及ぼす SHM の影響を調べたところ，SHM はデオキシヌクレオチド合成系の Key enzyme であるリボヌクレオチド還元酵素と dTMP 合成酵素を阻害することを明らかにした。この阻害は SHM のアグリコン部分の構造類似体である N-エチルマレイイミド（NEM）の作用に類似し，SH 基阻害作用に由来することが示唆された。

さらに著者は ^{14}C -SHM を調製し，これを種々の条件で大腸菌にあたえ，細胞内へのとりこみを観察した。SHM のとりこみは温度に依存し，アザドまたは NEM により阻害された。またとりこみは各種のヌクレオシドにより阻害され，SHM はヌクレオシド類と共通の透過系により細胞中にとりこまれることが示唆された。

著者はまた多数の SHM 耐性大腸菌変異株を分離した。得られた変異株の NEM に対する感受性は親株にほぼ等しいが，SHM および多くのヌクレオシドのとりこみ能が低下していた。この原因はヌクレオシドの透過系が遺伝的に変異したためである。

以上の結果より，SHM はヌクレオシドアナログとして細胞のヌクレオシド透過系により細胞内にとりこまれ，細胞内ではマレイイミド部分による特殊な SH 基阻害作用により，デオキシヌクレオチド合成系を阻害し，DNA 合成に障害をあたえるものと結論した。ヌクレオシドや SH 化合物が SHM の阻害作用を解除する原因は，これら化合物が SHM の透過を阻害するためであると理解される。

以上のように本論文は基礎的ならびに応用上微生物学に貢献するいくつかの新知見を含み，三委員とも著者は農学博士の学位を授与される充分の資格があると判断した。